大鼠妊娠过程的尿蛋白组变化

汤抒璇[1]，高友鹤[1*]

[1]（北京师范大学生命科学学院基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

*为通讯作者

摘要

目的：怀孕是身体生理状态产生极大变化的过程，正常的妊娠过程对保证胎儿发育正常和健康的母体非常重要，我们试图探索尿蛋白组变化能否反映妊娠过程。

方法：我们分别收集孕鼠妊娠 0 天、2 天、12 天、14 天、16 天、18 天和 20 天的尿样，通过 LC-MS 高通量质谱分析不同时间的尿蛋白组，分别与妊娠第 0 天比较得到的差异蛋白进行生物学通路分析。

结果：妊娠第 2 天尿蛋白组的变化与胚胎着床、胎盘的分化相关的通路，妊娠后期（E16 和 E18），尿富集到与器官发育相关的通路，主要是肺发育相关的通路。有趣的是，据之前的报道，尿里发现着床相关的通路的时间点刚好在大鼠着床期内；大鼠肺发育主要是在妊娠后期(E11-E21)，我们发现尿里肺发育相关的通路也与这一时期相符。此外，从妊娠后期到分娩，发现凝血系统相关的过程不断显著，与之前报道过的妊娠过程中凝血功能不断增强的趋势一致。

结论：（1）尿蛋白组可以反映正常妊娠过程；（2）尿可能成为监测妊娠过程的有效策略。

关键词：妊娠过程；胚胎发育；尿蛋白组

Urine proteome changes during pregnancy in rat

Shuxuan Tang[1] Youhe Gao[1*]

[1]（Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Life Science College, Beijing Normal University, Beijing 100875, China ）

*corresponding author

Abstract

Objective: Pregnancy involves a tremendous flow of physiological changes. Normal pregnancy is essential to ensure healthy maternal and fetal development. We sought to explore whether the urinary proteome could reflect the pregnancy process.

Methods: Urine samples were collected from pregnant rat on day 0, 2, 12, 14, 16, 18 and 20 of gestation, respectively. Urine protein proteome were profiling by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and the significantly changed proteins obtained were compared with on day 0 of gestation for biological pathway analysis.

Results: The pathways associated with embryo implantation and placental differentiation on gestation day 2, the pathways associated with organ development the latter half of pregnancy, and Among these pathways are mainly those development-related pathways. Interestingly, Implantation-related pathways were found in urine at the exact time of implantation period in rats according to previous reports; Rat lung development occurs mainly in the latter half of pregnancy (E11-E21), and we found that lung development related pathways are also consistent with this period. Furthermore, coagulation associated pathway were found to be increasingly prominent from the latter half of pregnancy to delivery, consistent with the previously reported trend of increasing coagulation function during pregnancy..

Conclusion: (1) Urinary proteome change can reflect normal pregnancy process; (2) Urine may be an effective strategy for monitoring pregnancy process

Keywords：Normal pregnancy; Embryonic development; Urinary proteome

1

①作者简介：汤抒璇，博士，研究方向是尿液蛋白组学在疾病中的应用
②通讯作者：高友鹤，教授，研究方向尿蛋白质组的应用，gaoyouhe@bnu.edu.cn；
③基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）;中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）北京师范大学（11100704）

1 引言

怀孕是身体产生很大生理变化的过程，包括很多代谢和激素的适应性改变。怀孕的某个阶段发生异常，都可能导致有害的后果[1]。全世界每年平均有 2 亿人怀孕、30 万例与怀孕和出生有关的产妇死亡以及 700 万例胎儿围产期死亡[2]。如何更有效的保证健康妊娠以及深入理解妊娠的过程，对胎儿的正常发育和减少母体的损伤非常重要。

目前临床监测胎儿发育的主要方法是超声检查 [3]。之前有报道，孕期血代谢组发现了大量与妊娠相关的代谢物和代谢途径[4]。尿标本容易获得，尿标本没有稳态机制在前期容易获得，并且可以积累疾病早期的变化[5]。尿反映精神类疾病，让我们惊讶的是相关蛋白透过血脑屏障在尿里富集，比如 PD[6]、自闭症[7]。尿在早期检测肿瘤的标志物有重要作用，在尿里发现神经胶质瘤的标志物[8]、尿反映极少数肿瘤细胞早期的变化[9]。

尿的变化非常敏感，我们试图通过动物实验探索尿蛋白组能否反映母体的变化以及胚胎生长发育的过程，分别于妊娠第 0 天、2 天、12 天、14 天、16 天、18 天和 20 天收集孕鼠的尿样，使用高通量 LC-MS 分析尿蛋白组。我们发现尿蛋白组可以反映不同阶段妊娠阶段的变化，在妊娠早期（E2），尿可以富集到与胚胎着床、胎盘的分化相关的通路；这些结果显示，尿蛋白组能反映妊娠过程中，母体和胚胎发育相关的变化，为监测正常妊娠过程提供线索。

2 材料方法

2.1 实验动物

妊娠 0 天 Wistar 孕鼠（n=10）购自北京维通利华实验动物有限公司均采用标准的实验室饲料饲养，室内温度（25℃±2◦C）和 12 小时/12 小时光照循环条件饲养。本实验经北京师范大学伦理与动物福利委员会批准（CLS-EAW-2020-022）。孕鼠前期 2 只/笼饲养，后期单只饲养。

2.2 准备样品

分别于妊娠第 0 天、2 天、12 天、14 天、16 天、18 天、20 天收集孕鼠尿液。所有孕鼠放置于代谢笼 12 h 取约 10ml 尿量，离心 30min，14000*g，4℃后置于-80℃储存。

每个样品取 4ml-6ml 尿量，先离心 14000*g，30min，4℃。接着加入至少 3 倍体积乙醇，置于-20℃过夜。每个样品加 Lysis buffer（(8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，50 mmol/L Tris，25 mmol/L 二硫苏糖醇)100μl 吹打沉淀。BCA 试剂盒定量蛋白浓度。

胰蛋白酶酶切 100μg 蛋白，FASTAP 酶切尿蛋白[4]。蛋白放置于 10KD 滤膜上（Pall，Port Washington，NY，USA），UA 溶液洗两遍，蛋白样品用 20 mmol/L

二硫苏糖醇(37◦C)还原 1 小时，并在黑暗中用 50 mmol/L 碘乙酰胺(IAA, Sigma)烷基化 45 分钟。YA 和 NH4HCO3 洗多次后按浓度比酶：蛋白 1：50 的比例加入胰蛋白酶，37℃，15 h

酶解后的肽段过除盐柱 HLB（Waters, Milford, MA, USA），并用真空冻干机冻干。

2.3 样品分级

酶切的肽段用 1‰稀释至 0.5μg/μl，所有样品（每个样品 1μg）混合为一个 mix 样品，置于在反相旋转高分离的 PH 柱子上（(84,868, Thermo Fisher Scientific)。洗脱液中加入不同浓度的乙腈（5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 和 50%），用不同浓度的乙腈洗脱肽段得到 10 个不同梯度的 fraction。这些肽段经过真空冻干用 20μl 1‰ 甲酸水复溶。

2.4 LC/MS 质谱分析

为矫正提取峰的保留时间，每个样品根据肽段：iRT 体积比 10：1 的比例加入 iRT。每个样品上样量 1μg，以 300μl/min 的速度流经 trap 柱（75 μm＊2 cm, 3 μm, C18, 100 Å），在分析柱（75 μm＊250 mm, 2 μm, C18, 100 Å)分离。4%-35%的 B 相梯度分离 90min，Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).分析。

10 个 fraction 用 DDA 质谱方法搜库，在 350-1500 m/z 范围内获得完整的 MS 扫描，分辨率设置为 120,000。MS/MS 扫描采用 Orbitrap 模式，分辨率为 30,000。

单个样品用 DIA 质谱方法，DIA 方法采用 36 个窗口的可变隔离窗口，全扫描分辨率为 60000，m/z 范围为 350 – 1400，DIA 扫描分辨率为 30000。所有样品混成一个 mix 做质控分析。

2.5 DIA 数据分析

分级的样品 DDA 的质谱方法得到的原 shi 数据导入 Proteome Discoverer (version 2.1; Thermo Scientific)，进行搜库，详细过程参照 Weijing 等[10]材料方法。

所有样品通过 DIA 质谱方法得到的原始数据，全部导入 Spectronaut。使用实现的 IDPicker 算法进行蛋白质分析，生成蛋白质组[11]。然后根据 Q 值小于 0.01(对应 FDR 为 1%)对所有结果进行筛选。通过对 MS2 中相应片段离子的峰面积求和计算肽强度。蛋白质强度的计算方法是将各自的肽强度相加。

2.6 数据分析

Spectronaut 处理后导出结果。筛选标准：错切率<1%，至少有两个独特的肽段被用来识别和鉴定蛋白。QC 样品被用作评价质谱的稳定性。我们用 sequential-KNN 的方法填充 mix 的缺失值（https://www.omicsolution.org/wkomics/main/），留下 QC CV<0.3 的蛋白，每个样品均使用 sequential-KNN 的方法填补缺失值。

单因素方差分析别用作组间数据的比较，每个妊娠时间点尿蛋白质组均需要与妊娠第 0 天比较得到差异蛋白。差异蛋白筛选标准：至少两个肽段被识别的蛋白；FC>1.5 或<0.67，t-test P 值<0.5。所有的结果都表示为平均值±标准差。

2.7 功能分析

生物过程、细胞成分和分子功能，通过 DAVID 网站使用 GO 对差异蛋白进行

分析。采用 IPA 软件(匠心系统，Mountain View, CA, USA)进行生物通路分析和疾病/生物功能分析。使用 GraphPad Prism 8.0.1 作图。

3 结果和讨论

3.1 建立孕鼠模型

本研究选用 Wistar 的雌性大鼠（n=10 ）分别和雄性大鼠（n=3）交配，雌鼠的体重变化如图 1 所示。每只雌鼠的产仔情况如表 1 所示，各孕鼠的产仔数量无显著差异，雌鼠均于 20-21 天产仔，说明这些雌鼠的妊娠过程基本一致，选择其中 5 只孕鼠在妊娠第 0 天、第 2 天、第 12 天、第 14 天、第 16 天、第 18 天、第 20 天，共 50 份尿样分析孕鼠妊娠尿蛋白组的变化。

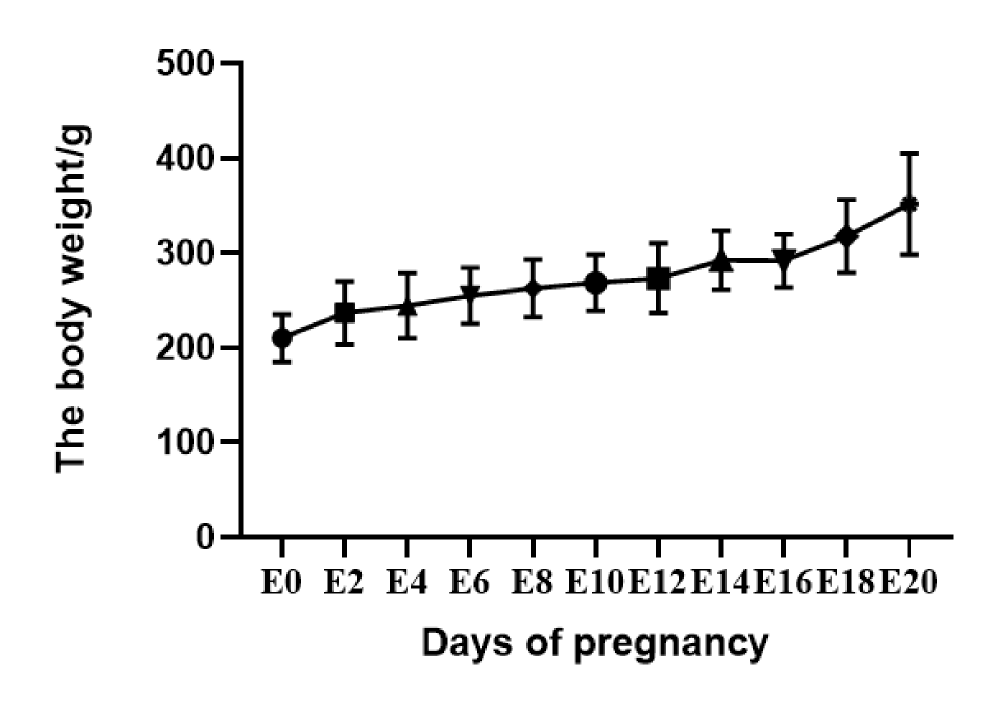


图 1 孕鼠体重变化，结果显示为平均值±标准差

表 1 孕鼠产仔数量，结果用平均值±标准差

No. of pregnant rat	Number of fetus	mean±SD
12#	18	
11#	15	
19#	17	15.4±1.854
13#	14	
23#	13	

3.2 孕鼠尿蛋白组的变化

我们采用 LC/MS 高通量质谱技术分析不同妊娠时间的尿蛋白组变化。怀孕组的每个孕鼠的每个时间点的尿蛋白组结果见补充表 1。每一个妊娠时间点均于妊娠第 0 天比较。根据筛选标准 FDR<1.0%，每个蛋白至少鉴定到 2 个肽段，共鉴定到 1621 个蛋白。我们先对 mix 进行缺失值填充，评估了 QC 的 CV 值，筛选条件 CV<0.3 的蛋白，得到 1604 个蛋白。通过悟空平台（https://www.omicsolution.org/wkomics/main/）缺失值补充得到 1209 个蛋白，这些蛋白用于之后的筛选和分析（补充表 2）。

每个时间点均与妊娠第 0 天进行比较得到差异蛋白，经过筛选（FC>1.5 或<0.67，p<0.05）分别得到妊娠第 2 天、第 12 天、第 14 天、第 16 天、第 18 天、第 20 天的差异蛋白 162 个、175 个、51 个、69 个、220 个和 200 个。各时间点的差异蛋白的 Veen 图如图 2 所示。图 2 所示妊娠第 2 天和第 20 天独有的差异蛋白较多，提示可能在妊娠初期和即将分娩的时期孕鼠生理过程差别较大。

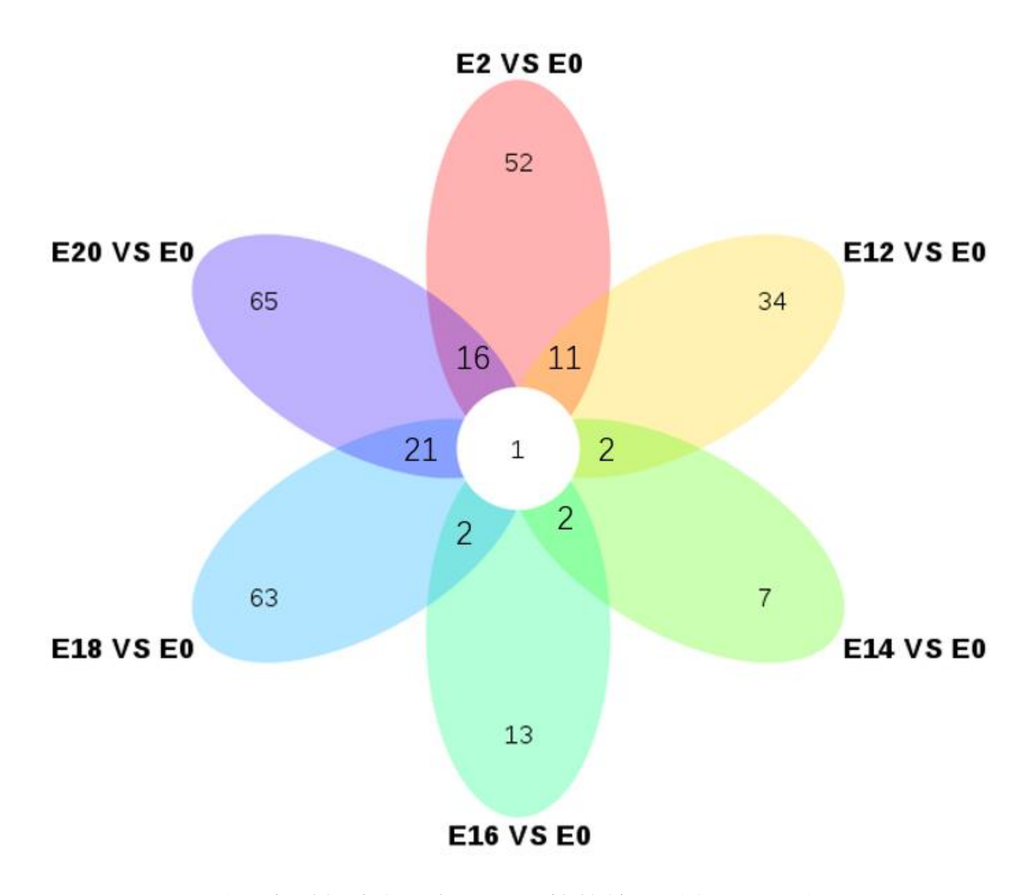


图 2 各时间点与妊娠 0 天比较的差异蛋白 Venn 图

3.3 妊娠前期变化的生物学过程

我们试图从尿蛋白组探索早期妊娠的生理变化过程，妊娠第 2 天的差异蛋白通过 IPA 分析生物学通路，我们结果显示，在早期妊娠阶段（图 3），妊娠第 2 天主要的生物学过程有 Wound Healing Signaling Pathway、Glucocorticoid Receptor Signaling 、Methylthiopropionate Biosynthesis 、Ascorbate Recycling (Cytosolic) 、Glutathione Redox Reactions II 、Lactose Degradation III、Th1 and Th2 Activation Pathway、Vitamin-C Transport. Glucocorticoid Receptor Signaling，糖皮质激素是细胞内信号转导的主要调控因子，可直接调控小鼠胚胎着床和子宫内膜的重塑[16]。值得注意的是，据报道，该生物学过程发生在大鼠的着床期内[12]，该通路在着床前发现，可能是为着床做准备。有报道体内用糖皮质激素可能对滋养层的发育和分化有不利的影响[17]。 Th1 and Th2 Activation Pathway，之前的研究表明 Th1/Th2 与正常的妊娠以及妊娠的并发症有关。临床证据和实验研究表明 Th1(炎症)反应在怀孕期间减弱，而 Th2 反应增强。 妊娠成功可能与母体 Th2 型免疫有关。另一方面，母体 Th1 型免疫可能对胎儿发育有害[18]。Vitamin-C Transport，维 C 是决定胎盘重量和婴儿体重重要因素，维 C 与滋养层细胞的分化有关。此外，维 C 与胎盘的固醇类激素合成有关，对胎儿的发育和维持妊娠至关重要[19]。该时期尿蛋白组产生的变化与胚胎着床、滋养层细胞的发育密切相关，进程与大鼠胚胎着床期时间一致，表明尿十分敏感可以反应早期妊娠的变化。

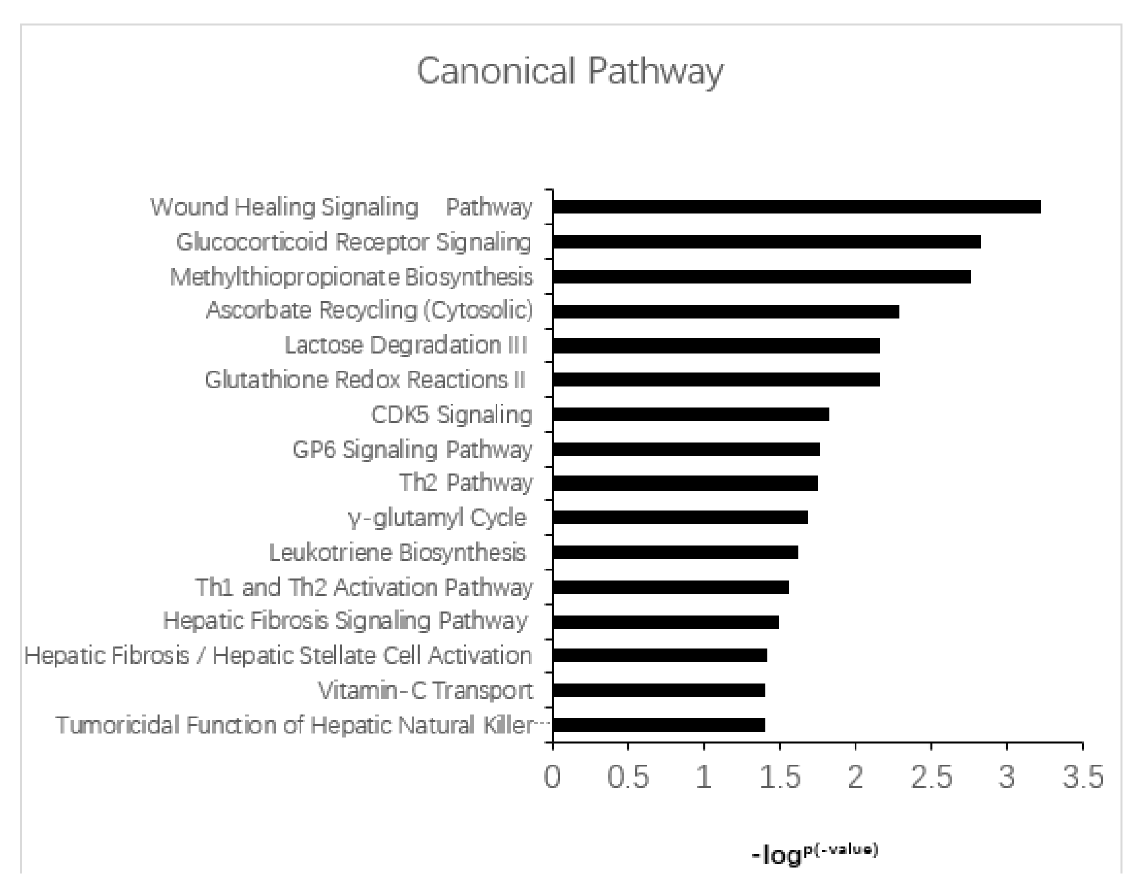


图 3 通过 IPA 分析生物学通路（P*<0.5）妊娠第 2 天生物学通路

3.4 妊娠后期的生物学过程

胚胎在母体内的生长发育影响妊娠后期母体的生理变化过程不同于前期，我们试图探索尿蛋白组妊娠后期的生物学过程，妊娠 12 天、妊娠 14 天、妊娠 16 天、妊娠 18 天、妊娠 20 天尿蛋白组富集的生物学通见图 4A、4B、4C、4D、4E。

妊娠 12 天变化的生物学通路有 Gα12/13 Signaling、Synaptogenesis Signaling Pathway、Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation、Signaling by Rho Family GTPases、GP6 Signaling Pathway、Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 妊娠 12 天 RHOGDI Signaling RHO 在调控滋养层细胞迁移发挥重要作用[20]。Hepatic Stellate Cell Activation 对肝的发育和造血功能有重要的作用。GP6 Signaling Pathway，GP6 与流产伴随血小板超聚集相关[21]。GP6 基因与孕妇流产相关[22]。妊娠 14 天找到的生物学通路有 Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease、Complement System、LXR/RXR Activation、Atherosclerosis Signaling、Prostanoid Biosynthesis、Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F、Coagulation System。妊娠 14 天开始出现凝血系统相关的通路。Complement System，补体途径在胎盘发育过程中必不可少，在保护妊娠正常进程中发挥重要作用[23]。Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F，研究发现，母体 IL-17 在后代行为异常中发挥作用。母体 IL-17A 诱导胎儿大脑皮质异常[24]。跟异常发育相关的因子在正常妊娠情况下尿里存在，提示尿有检测发育异常的潜力。妊娠 16 天的

生物学通路有 cell migration、cellular response to platelet-derived growth factor stimulus、positive regulation of defense response to virus by host、epidermal growth factor receptor signaling pathway、ubiquitin homeostasis、negative regulation of cholesterol efflux、blood coagulation。cellular response to platelet-derived growth factor stimulus，PDGF-BB 增加了心肌和肌原纤维的紧致区，PDGF-AA 影响心肌壁中央区域的肌原纤维组织。神经管缺陷、角膜散光和心脏流入道缺损需要胚胎发育的特殊阶段有关需要 PDGF 参与[25]。epidermal growth factor receptor signaling pathway,EGF 是参与胎儿肺发育的众多调节肽生长因子和激素之一。EGF 是一种与细胞表面受体结合的有丝分裂多肽，是细胞分化和胎儿肺表面活性物质合成的重要调控因子，可能作为一种潜在的新型早产儿治疗药物;表皮生长因子(EGF)和孕激素已被发现在生长的胎盘中合成，并参与其血管发生、血管生成、生长和分化[26]。negative regulation of cholesterol efflux，在怀孕期间，母亲的胆固醇水平在生理上逐渐增加，有证据表明，由于怀孕期间母体胆固醇水平升高,内皮功能障碍和泡沫细胞形成(即早期动脉粥样硬化病变)都可能在胎儿宫内生命期间的血管中开始[27]。妊娠 18 天主要的生物学过程有 Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease、Glucocorticoid Receptor Signaling、WNT/β-catenin Signaling、Complement System、Th2 Pathway、PCP (Planar Cell Polarity) Pathway。该时期富集到的这些通路与器官生长发育相的通路，Glucocorticoid Receptor Signaling，据报道显示肺是胚胎发生过程中最重要的糖皮质激素靶组织之一[28]。GR 受阻导致细胞外基质合成缺陷而导致腹壁形成的发育异常。糖皮质激素可以通过改变调节胰腺分化的转录因子的平衡[29]。WNT/β-catenin Signaling，Wnt/β-catenin 是一种信号蛋白，在肺发育、损伤和修复中发挥关键作用，而 Wnt/β-catenin 信号的异常表达导致哮喘气道重塑:以气道平滑肌细胞增生增生、肺泡和血管损伤杯状细胞化生、细胞外基质沉积为特征;导致肺顺应性下降，气道阻力增加[30]。PCP (Planar Cell Polarity) Pathway，在胚胎发育过程中，PCP 通路调控细胞群的协调行为，指导形态发生过程，如聚集扩展和集体细胞迁移。研究表明 PCP 参与肺部纤毛定向运动[31]。PCP 在输尿管芽的发生以及肾脏的发育中发挥重要的作用。PCP 的关键基因 Vangl2, Vangl2 通过调节 CE 和 AC 来控制肾小管的形成[32]。我们关注到大鼠肺发育的过程，在妊娠最后阶段（>21 天）肺最终发育成熟，提示这些通路可能来自胚胎的生长发育。在该时期反映肺发育过程。之前的报道显示鼠的肺的发育主要在妊娠后期，直到出生后才完全成熟 [33]，我们的结果显示，在妊娠 18 天富集到的多个生物学通路与肺发育有关，说明该阶段可能胎儿肺发育显著，与报道肺的发育进程相符。妊娠 20 天主要富集的通路有 Extrinsic Prothrombin Activation Pathway、Thymine Degradation、GP6 Signaling Pathway、Coagulation System、Role of Tissue Factor in Cancer、Complement System、IGF-1 Signaling、Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates、Eicosanoid Signaling。 GP6 Signaling Pathway，该时期的 GP6 糖蛋白通路主要与凝血功能相关，血小板通过 GP6 受体与胶原蛋白的相互作用导致血小板活化和粘附，这是血栓形成所必需的过程。GP6 是血小板跨膜糖蛋白，在胶原启动的信号转导和血小板促凝活性中发挥重要作用[34]。IGF-1 Signaling，孕期母体 IGF-1 缺乏会导致胎盘功能障碍，影响宫内生长[35]

Prostanoid Biosynthesis，内源性前列腺素的产生与人类分娩有关，母体血浆、羊水和尿液中的前列腺素水平在分娩开始前都会上升，随着分娩，前列腺素水平会持续升高，前列腺素似乎与分娩期间观察到的收缩活动增加有关[36]。。此外一些与凝血相关的通路 Extrinsic Prothrombin Activation Pathway 和 Coagulation System 也发生了显著的变化。随着妊娠的进展，纤维蛋白原浓度和血小板计数增加，提示有一种生理反应来防止分娩时延长的出血[37]。从妊娠早期到妊娠晚期，随着胎龄的增加，凝血功能逐渐增强，凝血酶生成增加，纤维蛋白溶解增加。这两种因素同时发生，在大多数情况下可导致高凝状态，这些变化被认为维持怀孕期间的胎盘功能，防止分娩时大量失血[38] 。我们的结果显示，从妊娠 12 天到第 20 天，富集到促凝相关的过程逐渐增加，在第 20 天富集到促凝相关的通路最多，为分娩做准备，这一过程与报道妊娠过程凝血功能的变化一致。

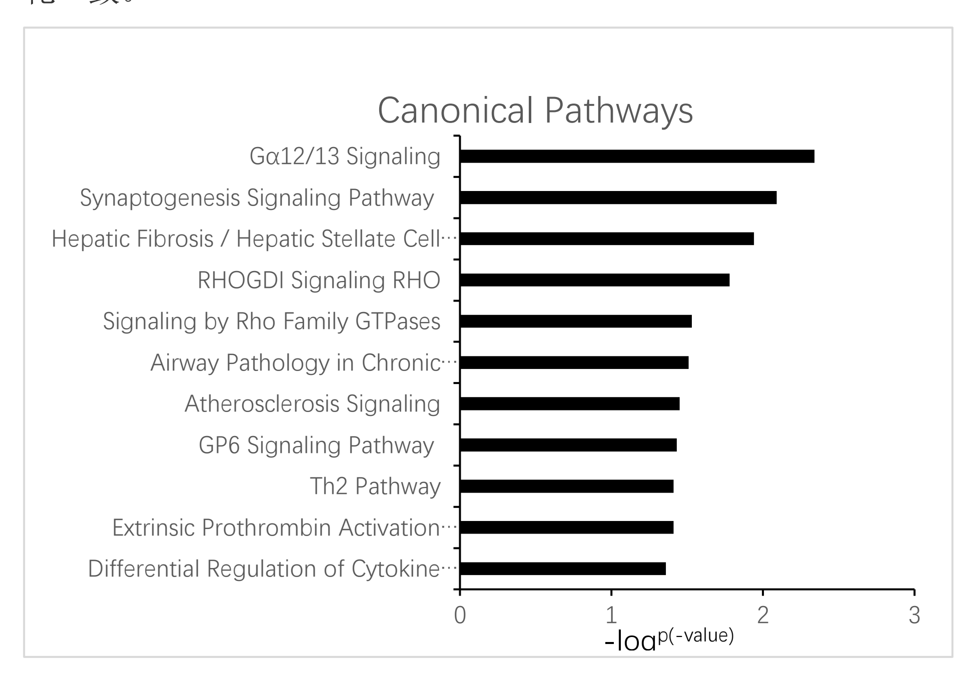


图 4A 通过 IPA 进行生物学通路分析（P^*<0.05），妊娠 12 天富集的生物学通路

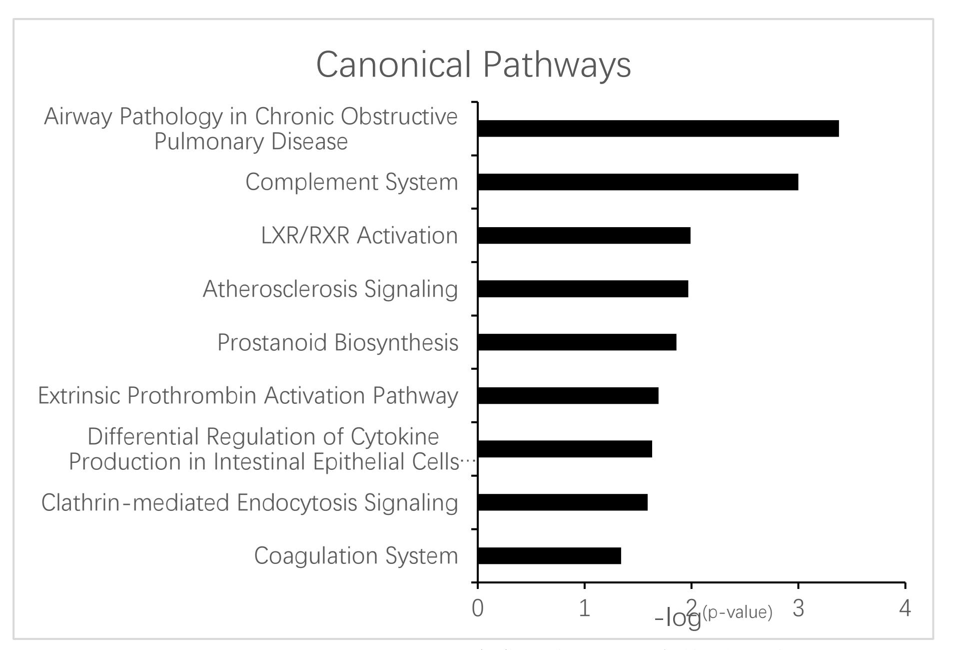


图 4B IPA 富集妊娠 14 天生物学通路

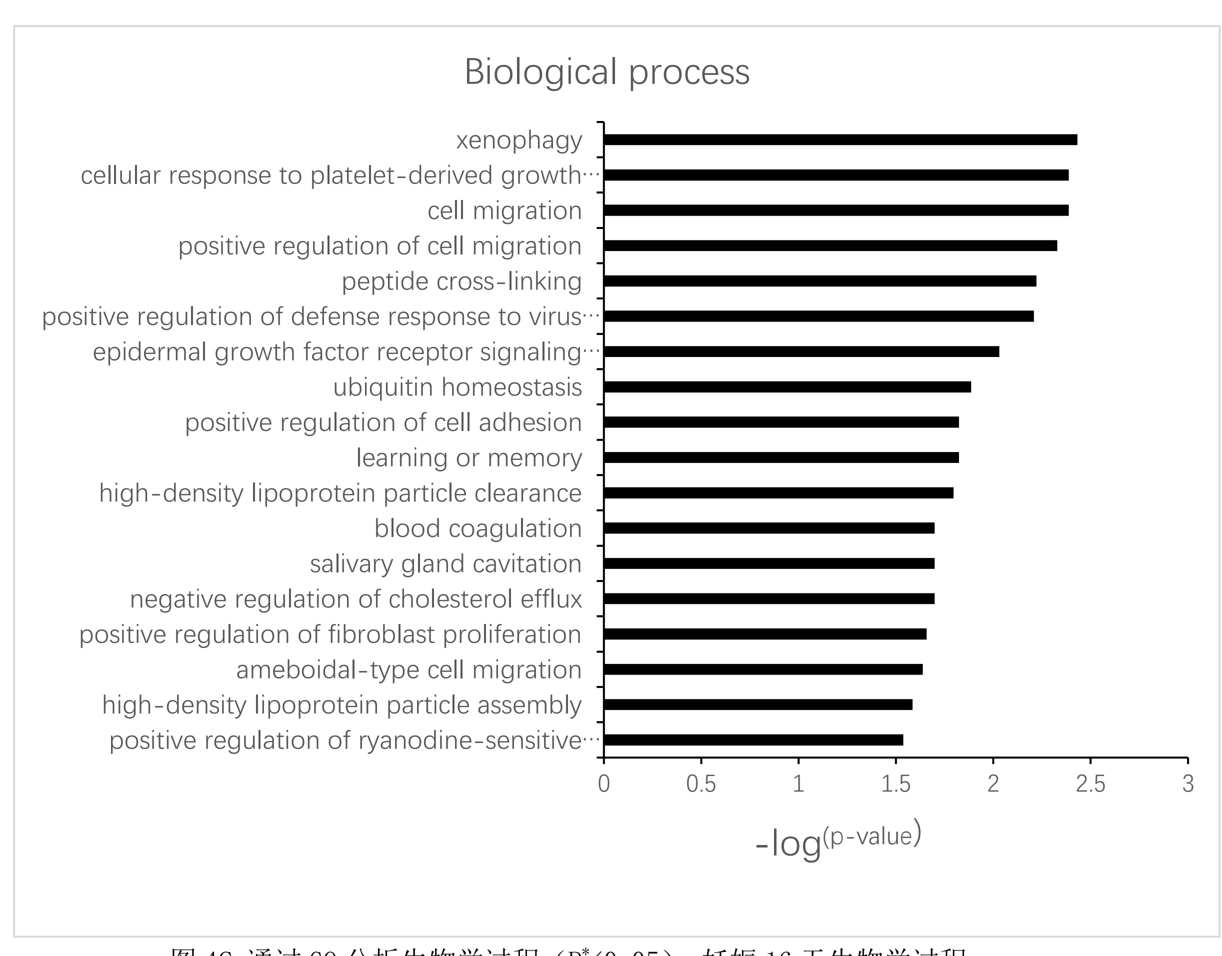


图 4C 通过 GO 分析生物学过程（P^{*}<0.05），妊娠 16 天生物学过程

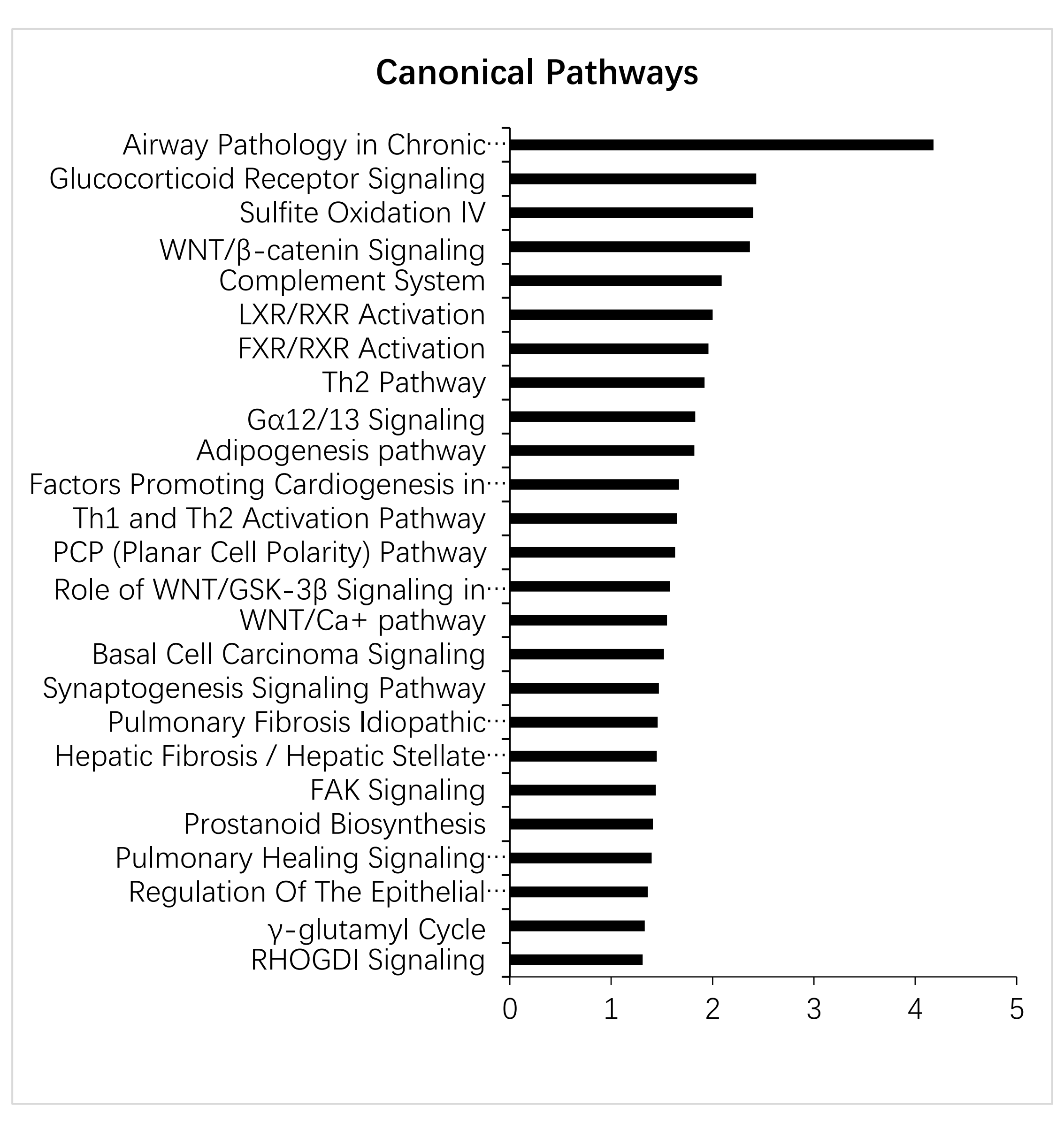


图 4D IPA 富集的妊娠 18 天生物学通路

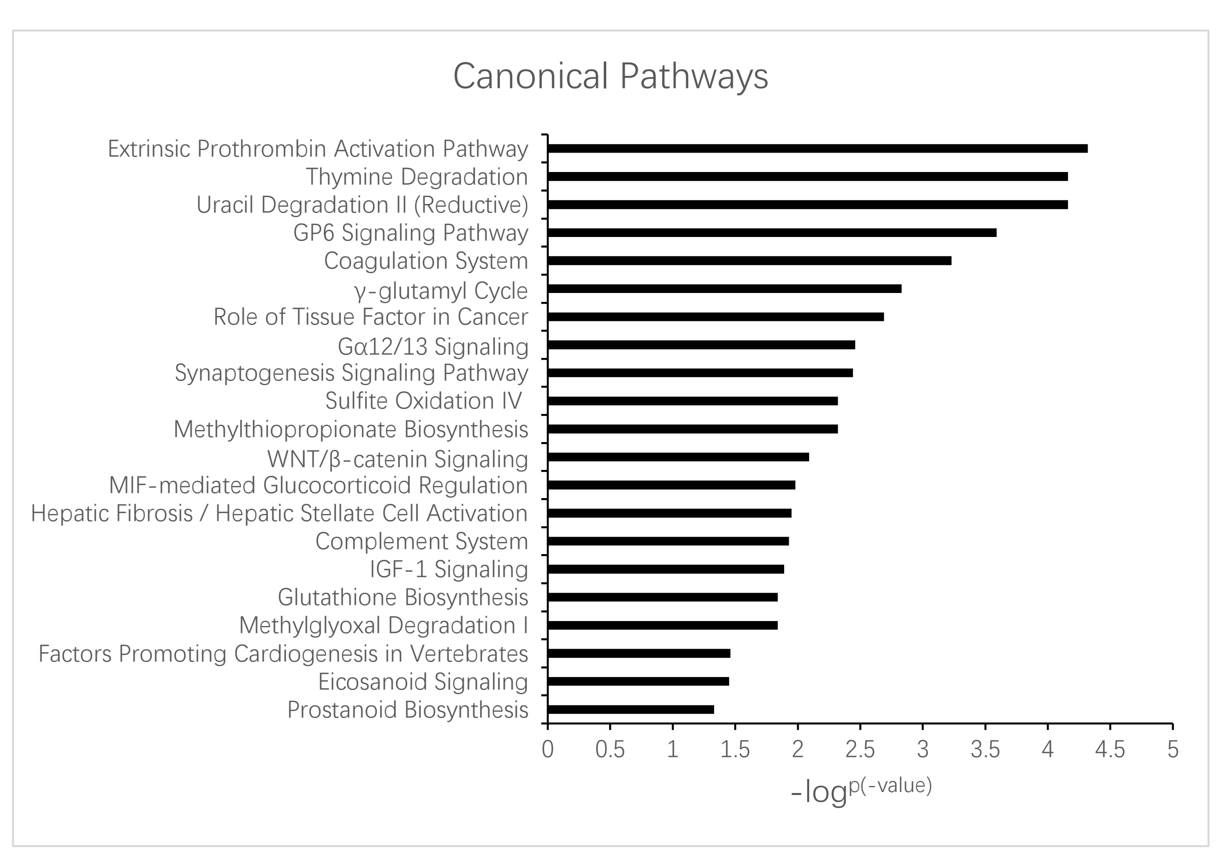


图 4E IPA 富集的妊娠 20 天生物学通路

我们的结果显示，尿蛋白组可以反映不同妊娠时间段的变化， 娠第 2 天，富集到与胚胎着床、滋养层细胞的分化有关的通路；在妊娠后期，妊娠 14 天出现凝血通路，16 天和 18 天显示较多器官生长发育的过程，包括胰腺、肺和肾。妊娠 18 天主要富集到与肺发育相关的通路。我们发现妊娠 20 天富集到凝血功能相关通路，我们关注到从妊娠 14 天持续到分娩前凝血相关的通路显著性增加。我们的结果显示，着床期内发现参与胚胎着床的通路；肺的发育在妊娠的最后阶段成熟以及凝血功能的不断增强，证明不同时间点富集到的生物学通路与相应时间段的妊娠过程一致。基于这些结果，提示尿蛋白组非常敏感地反映妊娠的不同阶段的过程，包含正常妊娠胚胎生长发育的信息。

本研究虽然基于动物实验，但结果提示我们未来需要纳入更多的临床样本探索孕妇尿蛋白组能否反映妊娠过程。孕妇正常妊娠尿蛋白组可能作为临床数据库，用作产检妊娠异常的有效方法之一。

4 结论

总而言之，尿在不同妊娠时间富集妊娠相关生物学过程，证明尿蛋白组能反映正常妊娠的过程。在临床上尿有潜力成为监测妊娠过程有效策略。

参考文献:

[1]Liang L, Rasmussen MH, Piening B, Shen X, Chen S, Röst H, Snyder JK, Tibshirani R, Skotte L, Lee NC, Contrepois K, Feenstra B, Zackriah H, Snyder M, Melbye M. Metabolic Dynamics and Prediction of Gestational Age and Time to Delivery in Pregnant Women. Cell. 2020 Jun

25;181(7):1680-1692.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.002.

[2]GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;**385**:117-171. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods. 2009 May;6(5):359-62. doi: 10.1038/nmeth.1322. Epub 2009 Apr 19.

[3]Syngelaki A, Hammami A, Bower S, Zidere V, Akolekar R, Nicolaides KH. Diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities on routine ultrasound examination at 11-13 weeks' gestation. Ultrasound Obstet Gynecol. 2019 Oct;54(4):468-476. doi: 10.1002/uog.20844.

[4]Liang L, Rasmussen MH, Piening B, Shen X, Chen S, Röst H, Snyder JK, Tibshirani R, Skotte L, Lee NC, Contrepois K, Feenstra B, Zackriah H, Snyder M, Melbye M. Metabolic Dynamics and Prediction of Gestational Age and Time to Delivery in Pregnant Women. Cell. 2020 Jun 25;181(7):1680-1692.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.002.

[5]Huan Y, Wei J, Zhou J, Liu M, Yang J, Gao Y. Label-Free Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Proteomic Analysis of the Urinary Proteome for Measuring the Escitalopram Treatment Response From Major Depressive Disorder. Front Psychiatry. 2021 Sep 30;12:700149. doi: 10.3389/fpsyt.2021.700149.

[6]Virreira Winter S, Karayel O, Strauss MT, Padmanabhan S, Surface M, Merchant K, Alcalay RN, Mann M. Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease. EMBO Mol Med. 2021 Mar 5;13(3):e13257. doi: 10.15252/emmm.202013257. Epub 2021 Jan 22.

[7]Meng W, Huan Y, Gao Y. Urinary proteome profiling for children with autism using data-independent acquisition proteomics. Transl Pediatr. 2021 Jul;10(7):1765-1778. doi: 10.21037/tp-21-193.

[8]we identified candidate urinary protein biomarkers with the potential to detect gliomas. This study will also provide clues for future biomarker studies involving brain diseases.

[9]Wei J, Meng W, Gao Y. Urine proteome changes in rats subcutaneously inoculated with approximately ten tumor cells. PeerJ. 2019 Sep 17;7:e7717. doi: 10.7717/peerj.7717. Pardi G, Cetin I. Human fetal growth and organ development: 50 years of discoveries. Am J Obstet Gynecol. 2006 Apr;194(4):1088-99. doi: 10.1016/j.ajog.2005.12.056.

[10]Wei J, Huan Y, Heng Z, Zhao C, Jia L, Yu Y, Gao Y. Dynamic urine proteome changes in a rat model of simvastatin-induced skeletal muscle injury. J Proteomics. 2022 Mar 15;254:104477. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104477. Epub 2022 Jan 3.

[11]Zhang B, Chambers MC, Tabb DL. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. J Proteome Res. 2007 Sep;6(9):3549-57. doi: 10.1021/pr070230d. Epub 2007 Aug 4.

[12]Oyesola T, Iranloye B, Adegoke O. Implantation and pregnancy outcome of Sprague-Dawley rats exposed to pirimiphos-methyl. Endocr Regul. 2019 Jul 1;53(3):139-145. doi: 10.2478/enr-2019-0014.

[13]Carty DM, Siwy J, Brennand JE, Zürbig P, Mullen W, Franke J, McCulloch JW, Roberts CT, North RA, Chappell LC, Mischak H, Poston L, Dominiczak AF, Delles C. Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. Hypertension. 2011 Mar;57(3):561-9. doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164285.
[14]Guo HX, Zhu YB, Wu CP, Zhong M, Hu SW. Potential urine biomarkers for gestational hypertension and preeclampsia. Mol Med Rep. 2019 Apr;19(4):2463-2470. doi: 10.3892/mmr.2019.9911. Epub 2019 Jan 30.
[15]Gao L, Zhang J, Ran X, Jia X, Xing Y, Dai T, Song W, Wu Z, Sun W, Shan D. Urinary Proteomics for Noninvasive Prenatal Screening of Trisomy 21: New Biomarker Candidates. OMICS. 2021 Nov;25(11):738-744. doi: 10.1089/omi.2021.0154. Epub 2021 Oct 28.
[16]Whirledge S, Kisanga EP, Taylor RN, Cidlowski JA. Pioneer Factors FOXA1 and FOXA2 Assist Selective Glucocorticoid Receptor Signaling in Human Endometrial Cells. Endocrinology. 2017 Nov 1;158(11):4076-4092. doi: 10.1210/en.2017-00361.
[17]Mandl M, Ghaffari-Tabrizi N, Haas J, Nöhammer G, Desoye G. Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. Reproduction. 2006 Jul;132(1):159-67. doi: 10.1530/rep.1.00976.
[18]Raghupathy R, Kalinka J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. Front Biosci. 2008 Jan 1;13:985-94. doi: 10.2741/2737.
[19]Schjoldager JG, Paidi MD, Lindblad MM, Birck MM, Kjærgaard AB, Dantzer V, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Maternal vitamin C deficiency during pregnancy results in transient fetal and placental growth retardation in guinea pigs. Eur J Nutr. 2015 Jun;54(4):667-76. doi: 10.1007/s00394-014-0809-6. Epub 2014 Dec 4. Erratum in: Eur J Nutr. 2015 Jun;54(4):677-8.
[20]Liu S, Cui H, Li Q, Zhang L, Na Q, Liu C. RhoGDI2 is expressed in human trophoblasts and involved in their migration by inhibiting the activation of RAC1. Biol Reprod. 2014 Apr 25;90(4):88. doi: 10.1095/biolreprod.113.111153
[21]Sokol J, Biringer K, Skerenova M, Hasko M, Bartosova L, Stasko J, Danko J, Kubisz P. Platelet aggregation abnormalities in patients with fetal losses: the GP6 gene polymorphism. Fertil Steril. 2012 Nov;98(5):1170-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1108. Epub 2012 Aug 14.
[22]Sokol J, Skerenova M, Biringer K, Simurda T, Kubisz P, Stasko J. Glycoprotein VI Gene Variants Affect Pregnancy Loss in Patients With Platelet Hyperaggregability. Clin Appl Thromb Hemost. 2018 Dec;24(9_suppl):202S-208S. doi: 10.1177/1076029618802358. Epub 2018 Oct 2.
[23]Teirilä L, Heikkinen-Eloranta J, Kotimaa J, Meri S, Lokki AI. Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. Semin Immunol. 2019 Oct;45:101337. doi: 10.1016/j.smim.2019.101337.
[24]Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffer CA, Littman DR, Huh JR. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. Science. 2016 Feb 26;351(6276):933-9. doi: 10.1126/science.aad0314. Epub 2016 Jan [25]Price RL, Haley ST, Bullard TA, Goldsmith EC, Simpson DG, Thielen TE, Yost MJ, Terracio L. Effects of platelet-derived growth factor-AA and -BB on embryonic cardiac development. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 May;272(1):424-33. doi: 10.1002/ar.a.10054.
[25]Okada T, Iwamoto A, Mukamoto M, Nakamura J, Kusakabe K, Kiso Y, Morioka H, Morikawa Y. Perinatal development of the rat kidney: apoptosis and epidermal growth factor. Congenit Anom (Kyoto). 2003 Sep;43(3):161-7. doi: 10.1111/j.1741-4520.2003.tb01039.x.
[26]Jojović M, Wolf F, Mangold U. Epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and progesterone promote placental development in rat whole-embryo culture. Anat Embryol

(Berl). 1998 Aug;198(2):133-9. doi: 10.1007/s004290050171.
[27]Cantin C, Arenas G, San Martin S, Leiva A. Effects of lipoproteins on endothelial cells and macrophages function and its possible implications on fetal adverse outcomes associated to maternal hypercholesterolemia during pregnancy. Placenta. 2021 Mar;106:79-87. doi: 10.1016/j.placenta.2021.02.019. Epub 2021 Mar 2.
[28]Li A, Hardy R, Stoner S, Tuckermann J, Seibel M, Zhou H. Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure. PLoS One. 2013 May 16;8(5):e63578. doi: 10.1371/journal.pone.0063578.
[29]Bréant B, Gesina E, Blondeau B. Nutrition, glucocorticoids and pancreas development. Horm Res. 2006;65 Suppl 3:98-104. doi: 10.1159/000091513. Epub 2006 Apr 10. Erratum in: Horm Res. 2006;65(6):294.
[30]Hussain M, Xu C, Lu M, Wu X, Tang L, Wu X. Wnt/β-catenin signaling links embryonic lung development and asthmatic airway remodeling. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017 Dec;1863(12):3226-3242. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.031. Epub 2017 Sep 1.
[31]Henderson DJ, Long DA, Dean CH. Planar cell polarity in organ formation. Curr Opin Cell Biol. 2018 Dec;55:96-103. doi: 10.1016/j.ceb.2018.06.011. Epub 2018 Jul 14.
[32]Derish I, Lee JKH, Wong-King-Cheong M, Babayeva S, Caplan J, Leung V, Shahinian C, Gravel M, Deans MR, Gros P, Torban E. Differential role of planar cell polarity gene Vangl2 in embryonic and adult mammalian kidneys. PLoS One. 2020 Mar 23;15(3):e0230586. doi: 10.1371/journal.pone.0230586.
[33]Wallen LD, Han VK. Spatial and temporal distribution of insulin-like growth factors I and II during development of rat lung. Am J Physiol. 1994 Nov;267(5 Pt 1):L531-42. doi: 10.1152/ajplung.1994.267.5.L531.
[34]Siddesh A, Parveen F, Misra MK, Phadke SR, Agrawal S. Platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI gene variants affect recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2014 Oct;102(4):1078-1084.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.002. Epub 2014 Jul 30.
[35]Walenkamp MJ, Losekoot M, Wit JM. Molecular IGF-1 and IGF-1 receptor defects: from genetics to clinical management. Endocr Dev. 2013;24:128-37. doi: 10.1159/000342841. Epub 2013 Feb 1.
[36]Khan AH, Carson RJ, Nelson SM. Prostaglandins in labor--a translational approach. Front Biosci. 2008 May 1;13:5794-809. doi: 10.2741/3117.
[37]Cui C, Yang S, Zhang J, Wang G, Huang S, Li A, Zhang Y, Qiao R. Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy. Thromb Res. 2017 Aug;156:82-86. doi: 10.1016/j.thromres.2017.05.021. Epub 2017 May 24.
[38]Urasoko Y, He XJ, Ebata T, Kinoshita Y, Kobayashi J, Mochizuki M, Ikeya M. Changes in blood parameters and coagulation-related gene expression in pregnant rats. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009 May;48(3):272-8.